

論文の内容の要旨

論文題目 **Imaging analysis on post-transcriptional events of miRNA in plant.**
(植物におけるマイクロ RNA の転写後動態に関するイメージング手法を用いた解析)
氏名 藤岡 容一郎

本研究の背景

マイクロ RNAs (miRNAs)は 18~25 塩基の small non-coding RNA であり、各々相補的な配列をもつ標的 mRNA の転写後調節を RNA Induced Silencing Complex (RISC)と呼ばれる複合体中で行っている。先行研究によりシロイヌナズナに代表される、植物での miRNA のプロセッシングには4種類存在する Dicer-like(DCL)タンパク質のうち、DCL1 が miRNA のプロセッシングに関わっていること、さらに HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1)というパートナータンパク質と相互作用することで、miRNA 前駆体の正確かつ効率的な切断を行っていることが示されている。また、成熟化した miRNA は RISC 中の Argonaute1 (AGO1) タンパク質に取り込まれ、その相補的な mRNA の分解もしくは翻訳制御が行われていると考えられている。近年、動物や酵母においては RISC が細胞質の顆粒状構造である Processing body(P-body)と呼ばれる場で機能していることが示唆されている。

本研究の目的

植物における miRNA 転写後動態において、その発現系の構築の困難さから DCL1 や AGO1 に関する研究はほとんど進んでいない。また、miRNA が関与する現象はダイナミックであることが予想される。そこで、miRNA に関わる因子である DCL1 や AGO1 などの発現系と同時

に、イメージング解析系を構築し、それらのリアルタイムでの相互作用の検出を行い、miRNA 転写後動態の解明を目的とした。

miRNA 生合成経路に関わる因子に関する解析

FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 及び BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) 法といったイメージング解析法を用いて miRNA 生合成に関わる因子である DCL1, HYL1, SE (SERRATE) 間の相互作用を生きた植物個体内で可視化した。その結果、これら3つの因子は核内の顆粒状構造で相互作用している事がわかった。

RNA を可視化する MS2-tag 法を用いて miRNA の前駆体を可視化したところ、miRNA の前駆体が核内の顆粒状構造に局在していることがわかった。そこで BiFC 法と MS2-tag 法を組み合わせた。その結果、miRNA 生合成に関わる前述の3つの因子が核内の顆粒状構造で miRNA 前駆体と共局在していたことが明らかとなった。動物では miRNA 生合成過程において miRNA 前駆体をプロセッシングする複合体”microprocessor”が形成されていることが報告されている。これらのことから植物においては DCL1, HYL1 および SE が核内顆粒状構造において miRNA 前駆体と複合体を形成し、microprocessor として働いている事が示唆された。

核内の様々な構造体のマーカータンパク質との共局在実験を行ったところ、microprocessor が SmD3 及び SmB といった Cajal body のマーカータンパク質と共局在した。このことから microprocessor が局在している顆粒状構造は Cajal bodies であることが示された。Cajal bodies には、クロマチンサイレンシングに関わる因子なども局在していることが明らかとなっており、miRNA 生合成過程との関連性も興味深い。

成熟化 miRNA が作用する場“P-body”の解析

Processing body (P-body) は mRNA の蓄積や分解などが行われている場であり、細胞質中の顆粒状構造として形成されることが動物や酵母において報告されている。また、P-body には脱キャップ酵素 DCP1 及び DCP2 が局在していることが分かっている。しかし、植物において

はそれらのホモログがあり、DCP2に脱キャップ活性があることが分かっているのみであった。本研究によって、植物においてDCP1及びDCP2が相互作用しながら細胞質中の顆粒状構造で共局在していることを示した。そして、その顆粒状構造がP-bodiesであることを見出した。

miRNA による翻訳制御機構において標的mRNA はRISCと呼ばれる複合体中で分解されると考えられている。RISCの主要因子はAGO1と呼ばれ、miRNA自身とそれに相補的なmRNAの取り込み及び翻訳制御を担っている酵素である。植物において、AGO1がDCP1と相互作用しながらP-bodiesに共局在することが分かった。このことから、RISCがP-bodiesに局在することが示された。

これまでmicroprocessorによってプロセッシングされた成熟化miRNAがどの因子によってRISCへ輸送されるかについては報告がなかった。本研究においてmicroprocessor の構成因子であるHYL1およびSEがP-bodiesにも局在し、AGO1やDCP2といったRISC構成因子と相互作用することが明らかとなった。以上のことより、これらの因子がmiRNAのRISCへの受け渡しに関与している可能性が示唆された。

本研究の総括

植物個体における miRNA 関連因子の発現系およびイメージング解析系を構築し、miRNA の転写後動態に関する研究を行った。その結果、これまで植物において未解明であった microprocessor、RISC、P-body の局在とそれらの構成因子の一部を明らかとした。また、成熟化 miRNA が microprocessor の因子によって RISC へ運ばれていることを示唆した。これは他の生物でも明らかにはされておらず、生物学に与えるインパクトは非常に大きいと考える。今後は生化学的手法や遺伝学的手法を用いた解析によって、より詳細な知見が得られることが期待される。